



(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 196 39 456 A 1

(21) Aktenzeichen: 196 39 456.2
(22) Anmeldetag: 25. 9. 96
(23) Offenlegungstag: 26. 3. 98

(5) Int. Cl. 6:
C 07 D 493/04
C 07 D 493/12
C 07 D 417/06
C 07 D 497/12
A 01 N 43/90
A 61 K 31/425
C 12 P 17/16
C 07 F 7/08
C 07 F 7/07
// (C07D 493/04,
303:00) C07D 313:00
(C07D 493/12,
303:00) C07D 313:00,
321:12 (C07D 417/06,
315:00) C07D 277:24

DE 196 39 456 A 1

(71) Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

(74) Vertreter:

Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Meyer, 81541
München

(72) Erfinder:

Höfle, Gerhard, Prof. Dr., 38124 Braunschweig, DE;
Kiffe, Michael, Dr., 79639 Grenzach-Wyhlen, DE

(54) Epothilon-Derivate, Herstellung und Mittel

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und
deren Verwendung.

AEGO - DEUTSCHE PATENT- UND MARKENANSTALT

DE 196 39 456 A 1

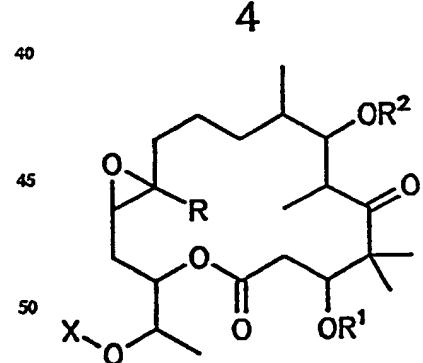
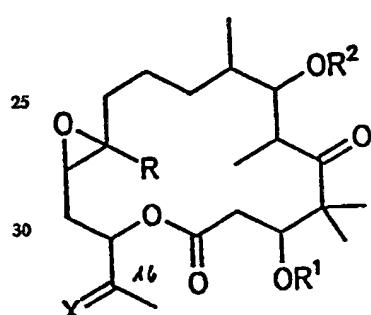
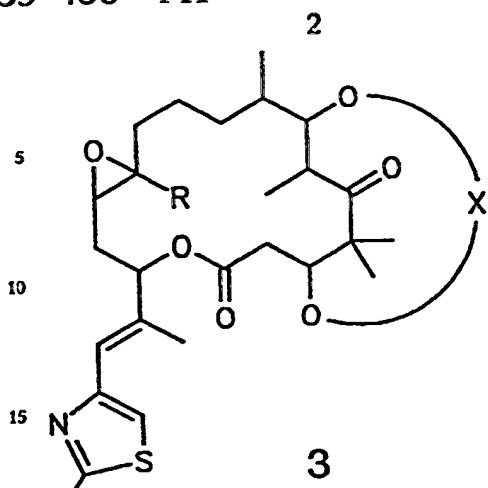
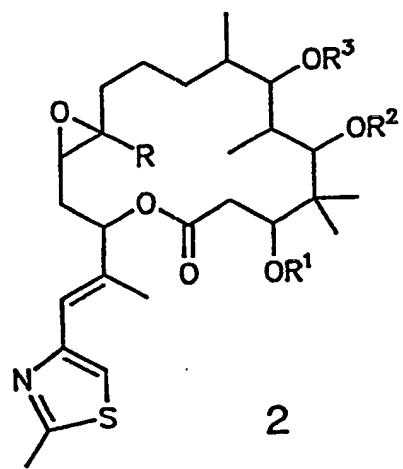
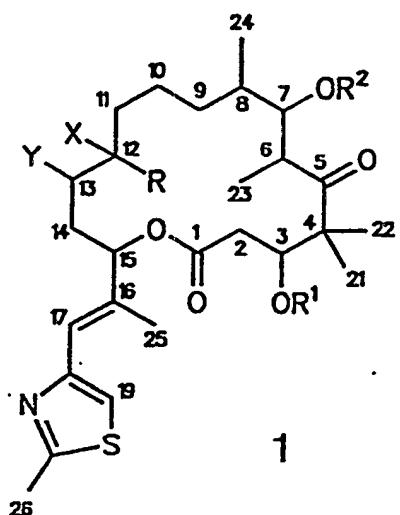
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01.98 802 013/499

14/30

1
Beschreibung

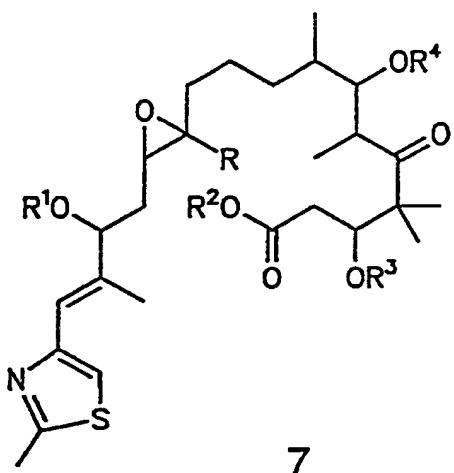
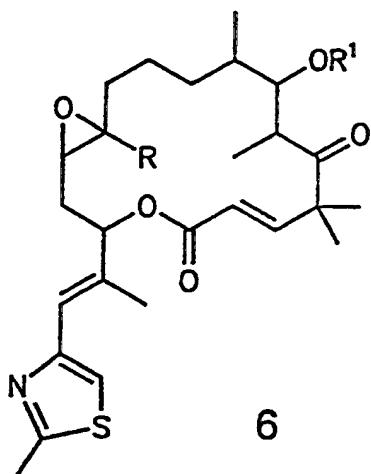
Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.



55

60

65



In der vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C₁-4-Alkyl;
R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁-6-Alkyl,
C₁-6-Acyl-Benzoyl,
C₁-4-Trialkylsilyl,
Benzyl,
Phenyl,
C₁-6-Alkoxy-,
C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

In der Formel 1 sind X und Y entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Halogen, OH, O-(C₁-6)-Acyl, O-(C₁-6)-Alkyl, O-Benzoyl.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, wobei R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR₂-, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR³, N-NR⁴R⁵, und N-NHCONR⁴R⁵, wobei die Reste R³

bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C₁-18-Alkyl, C₁-18-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042. Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydride X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z. B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z. B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH₃/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z. B. mit NaBH₄ in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionalen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z. B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z. B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fiechmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrzone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinition in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z. B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z. B. bei O-Formyl durch NH₃/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z. B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z. B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten,

z. B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorfzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Cesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonederivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonederivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel (n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken, so daß sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1

Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 µl (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50°C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15). Ausbeute: 4 mg (19%) Isomer I
4 mg (19%) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46
IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1} .
MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100) 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).
Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für

[M-H₂O]⁺
gef.: 493.2478

Isomer II

- 5 R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22
IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w) cm^{-1} .
10 MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H₂O]⁺), 394 (12), 306 (46) 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100) 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).
Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für [M-H₂O]⁺
15 gef.: 493.2475

Beispiel 2

Verbindung 1b

- 20 55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32%).
 R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46
IR (Film): ny = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m) 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .
UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.
MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).
40 Hochauflösung: $C_{26}H_{40}O_6CINS$ ber.: 529.2265 für [M⁺]
gef.: 529.2280

Beispiel 3

Verbindung 1c

- 45 25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 µl (0.081 mmol) Triethylamin und 20 µl (0.517 mmol) 98%-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15°C werden dem Reaktionsgemisch 40 µl (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 50 70 Minuten bei μ 15°C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7 µl (0.047 mmol) Triethylamin, 2 µl 98%-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 µl (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schicht-

chromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).
Ausbeute: 5 mg (18%).
R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.67
IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch) 737 (s) cm⁻¹
MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).
Hochauflösung: C₂₉H₄₀O₉NSCl ber.: 613.2112 für [M⁺] gef.: 613.2131

Beispiel 4

Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 1 mg (9%)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38
MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).
Hochauflösung: C₂₇H₄₂O₆NSCl ber.: 543.2421 für [M⁺] gef.: 543.2405

Beispiel 5

Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreaktiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 – grad – nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20%)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27
IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch) 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹
MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).
Hochauflösung: C₂₆H₄₁O₆NS ber.: 495.2655 für [M⁺] gef.: 495.2623

Beispiel 6

Verbindung 3a – d (a – d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 µl (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a – d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

15 Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12%)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50
IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs) 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm⁻¹
UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm
MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).
Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]

25 Verbindung 3b

30 Ausbeute: 14 mg (13%)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44
IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s) 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch) 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.
UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm
MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42) 41 (19).
Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺] gef.: 539.1998

40 Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4%)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38
MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).
Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺] gef.: 539.2001

55 Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1%)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33
MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35).
Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺] gef.: 539.1997

65 Beispiel 7

Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70°C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch präparative Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64%)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

Hochauflösung: C₂₁H₃₄O₇ ber.: 398.2305 für [M⁺]

gef.: 398.2295

Beispiel 8

Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 27 µl (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanolösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22%)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₅NS ber.: 475.2392 für [M⁺]

gef.: 475.2384

Beispiel 9

Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90°C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel be-

freit. Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

⁵ Ausbeute: 7 mg (15%)

Substanzcode

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C₂₇H₃₃O₆NS ber.: 503.2342 für [M⁺]

gef.: 503.2303

Beispiel 10

Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanolösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50°C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67%)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M⁺]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: C₂₈H₃₉O₆NS ber.: 517.2498 für [M⁺]

gef.: 517.2492

Beispiel 11

Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52%)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: C₂₃H₃₃O₄NS ber.: 423.2443 für [M⁺]

gef.: 423.2410

Beispiel 12

Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanolösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50°C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59%)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ν = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg ε) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: C₂₉H₄₅O₃NS ber.: 567.2866 für [M⁺] gef.: 567.2849

Beispiel 13

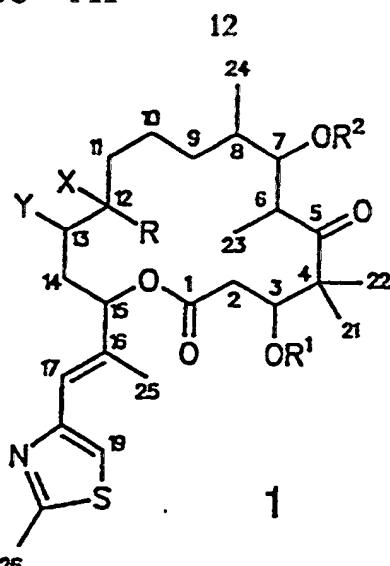
50 mg Epothilon A werden in 20 µl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7.1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30°C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96%).

Beispiel 14

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühen mit 40 µl Triethylamin und 16 µl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

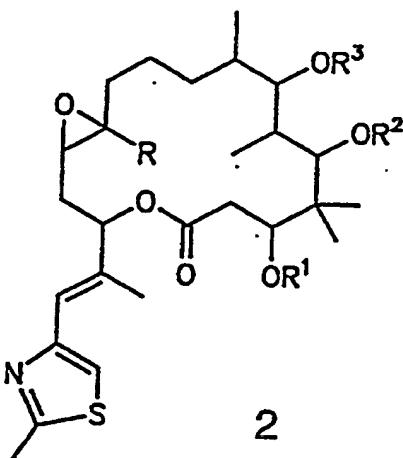
Patentansprüche

1. Epothilonderivat der Formel 1



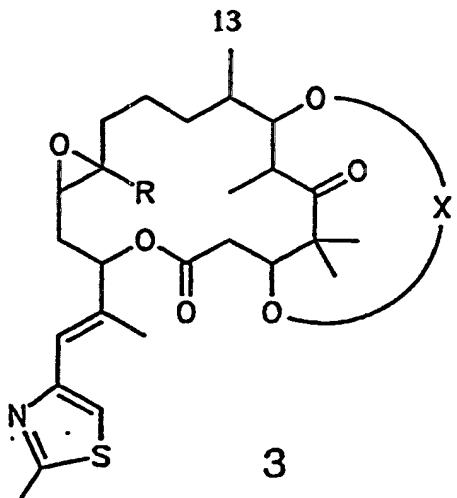
wobei R = H, C₁-4-Alkyl; R¹, R² = H, C₁-6-Alkyl, C₁-6-Acyl, Benzoyl, C₁-4-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁-6-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X und Y entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Halogen, OH, O-(C₁-6)-Acyl, O-(C₁-6)-Alkyl, O-Benzoyl stehen.

2. Epothilonderivat der Formel 2



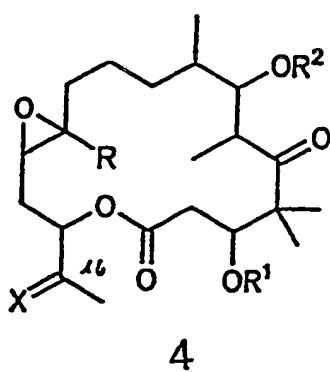
wobei R = H, C₁-4-Alkyl; R¹, R², R³ = H, C₁-6-Alkyl, C₁-6-Acyl, Benzoyl, C₁-4-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁-6-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

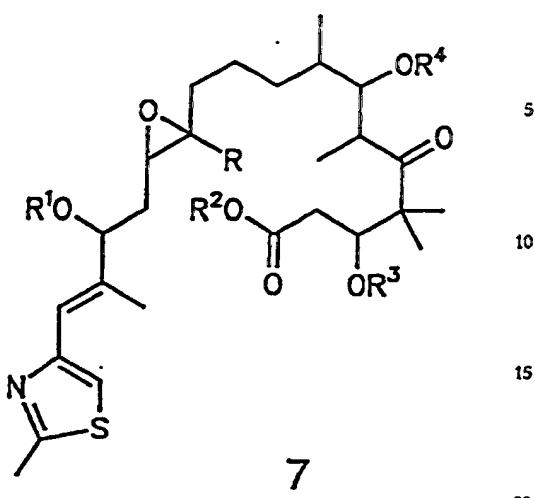
3. Epothilonderivat der Formel 3



wobei R = H, C₁-4-Alkyl; R¹, R² = H C₁-6-Alkyl, C₁-6-Acyl, Benzoyl, C₁-4-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁-6-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -O(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²- und -SiR₂- steht, wobei R, R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben und R¹ und R² auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können.

4. Epothilonederivat der Formel 4





wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl und R¹, R², R³, R⁴ = H,
C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆

-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,
C₁₋₆-Alkoxy-C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensub-
stituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den
in den Resten enthaltenen Alkylbzw. Acylgruppen
um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.
8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderi-
vats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch ge-
kennzeichnet, daß man Epothilon A, Epothilon B,
ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein
7-OH-geschütztes Derivat derselben

(a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit
einer Esterase oder Lipase, oder

(b) in alkalischen Medium hydrolysiert, insbe-
sondere mit Natriumhydroxid in einem Metha-
nol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderi-
vat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderi-
vats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch ge-
kennzeichnet, daß man ein Epothilonderivat der
Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des
Verfahrens gemäß Anspruch 8

(a) nach der Yamaguchi-Methode oder

(b) nach der Corey-Methode oder

(c) nach der Kellogg-Methode

in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt
und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirt-
schaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau,
bestehend aus einem oder mehreren der Verbin-
dungen gemäß einem der vorangehenden Ansprü-
che oder einer oder mehreren dieser Verbindungen
neben einem oder mehreren üblichen Träger(n)
und/oder Verdünnungsmittel(n).

11. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Ein-
satz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder
mehrerer der Verbindungen nach einem oder meh-
rerer der Verbindungen nach einem oder mehreren
der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder mehre-
rer der Verbindungen nach einem oder mehreren
der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren
üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel
(n).

- Leerseite -